

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° d'publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 695 317

②① N° d'nr gistroment national : **92 10644**

⑤① Int Cl⁵ : A 61 K 31/195

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 07.09.92.

③⑦ Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 11.03.94 Bulletin 94/10.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : Société dite : LABORATOIRES
MONAL — FR.

⑦② Inventeur(s) : Sauvaire Yves et Rives Gérard.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : Cabinet Herrburger.

⑤④ Composition apte à stimuler la sécrétion d'insuline destinée au traitement du diabète non insulino-dépendant.

⑤⑦ Composition antidiabétique, caractérisée en ce qu'elle
renferme en tant que substance active, à l'état libre ou
combiné, au moins un acide aminé mono ou polyhydroxylé
et/ou ses formes lactoniques.

FR 2 695 317 - A1

" Composition apte à stimuler la sécrétion d'insuline destinée au traitement du diabète non insulino-dépendant"

La présente invention se rapporte à une
5 composition antidiabétique spécialement destinée au traitement du diabète de type II ou diabète non insulino-dépendant.

Il est connu que le diabète touche,
aujourd'hui, plus de trente millions d'individus dans
10 le monde, prenant la dimension d'un phénomène majeur sur le plan de la santé publique : à titre d'exemple on considère que, dans les pays européens, le diabète atteint entre 2 et 5 % de la population, et qu'en France, environ 3 à 4 % des habitants souffrent de
15 diabète non insulino-dépendant qui est de loin le plus fréquent et en particulier entre 5 et 10 % des sujets âgés de 60 à 70 ans.

De plus, et pour diverses raisons liées notamment à la richesse alimentaire, l'obésité, le
20 tabagisme ou encore la diminution de l'activité physique, le nombre de diabétiques aurait doublé en France en une vingtaine d'années, essentiellement du fait d'une augmentation du diabète non insulino-dépendant.

25 Cette affection est caractérisée par un défaut de régulation de la sécrétion d'insuline associée ou non à une insulino-résistance des tissus

périphériques. L'altération du fonctionnement des cellules B pancréatiques qui synthétisent l'insuline, survient dès la phase initiale du diabète non insulino-dépendant. Elle se traduit par une très nette
5 diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation glucosée.

Pour traiter cette maladie, les spécialistes ont en conséquence été tout naturellement amenés à rechercher des produits susceptibles de stimuler la
10 sécrétion d'insuline ; parmi ceux-ci, seuls les sulfamides (sulfonylurées) ont révélé une efficacité : ce sont, en conséquence, les seuls médicaments de ce type qui sont actuellement proposés sur le marché.

Cependant, malgré leurs avantages, les
15 sulfonylurées présentent un certain nombre d'inconvénients avant tout liés aux difficultés rencontrées pour déterminer la posologie adéquate ; il en résulte des risques de surdosage pouvant provoquer fréquemment des hypoglycémies, avec risque de coma
20 hypoglycémique, notamment chez les personnes âgées.

Il serait en conséquence souhaitable de pouvoir disposer d'un médicament de nature à se substituer aux sulfonylurées pour stimuler la sécrétion d'insuline, tout en ne présentant pas les
25 inconvénients susmentionnés.

Il s'agit là du but que l'on s'est fixé conformément à l'invention.

Pour parvenir à celui-ci, on s'est souvenu que les anciens préconisaient, pour le traitement du
30 diabète, des décoctions de graines d'une espèce particulière de trigonelle qui apparaissait déjà dans les pharmacopées grecques et latines : le fenugrec, Trigonella foenum graecum L., légumineuse facilement cultivable dans la région méditerranéenne.

35 On a alors eu l'idée de vérifier l'activité

de cette plante, et d'analyser celle-ci par des fractionnements très poussés dans le but de rechercher d'éventuels constituants qui pourraient être responsables de cette activité.

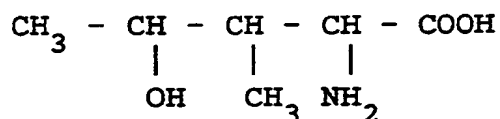
5 On a ainsi été amené à mettre en lumière les propriétés antidiabétiques de certains dérivés d'acides aminés.

L'invention concerne donc une composition antidiabétique contenant de tels dérivés.

10 Cette composition antidiabétique est caractérisée en ce qu'elle renferme en tant que substance active, à l'état libre ou combiné, au moins un acide aminé mono ou polyhydroxylé et/ou ses formes lactoniques.

15 Selon une autre caractéristique de l'invention, la composition renferme un produit provenant de la métabolisation de la substance active.

Parmi les acides aminés susmentionnés, le plus actif s'est révélé être la 4 hydroxyisoleucine de
20 formule :



25 et/ou sa forme lactonique.

En conséquence, la composition antidiabétique conforme à l'invention renferme de préférence ce composé.

30 Cette composition peut être administrée par voie orale, intraveineuse ou intramusculaire, et renferme des excipients qui sont choisis en fonction de la forme galénique adoptée.

La posologie peut elle aussi varier dans de larges limites sans pour cela sortir du cadre de
35 l'invention et dépend, en fait de chaque cas

particulier à traiter.

La substance active peut, bien entendu, sans sortir du cadre de l'invention être d'origine quelconque, et en particulier être obtenue par
5 synthèse. Cependant, et pour des raisons à la fois d'ordre philosophique et écologique, les spécialistes cherchent de plus en plus à proposer des produits dits "naturels" et la composition conforme à l'invention est avantageusement dérivée du règne végétal.

10 On a, à cet effet, pu constater que les trigonelles : Trigonella sp. renferment des quantités utilisables non négligeables d'acides aminés hydroxylés conformes à l'invention présentant une activité antidiabétique, et en particulier que les
15 graines de fenugrec renferment en quantité notable la 4 hydroxyisoleucine.

L'invention se rapporte en particulier à une composition douée de propriétés insulino stimulantes pouvant servir de réactif pour l'exploration
20 fonctionnelle du pancréas endocrine.

Un procédé d'obtention de la 4 hydroxyisoleucine à partir de graines de fenugrec sera décrit ci-dessous dans l'exemple 1 :

Exemple 1

25 On rassemble des graines de fenugrec que l'on soumet à un broyage et à une extraction préalable à l'hexane à température ambiante de façon à obtenir 100 grammes de tourteau délipidé.

On soumet ensuite ce tourteau à six
30 extractions hydro alcooliques successives avec de l'éthanol à 70 % à température ambiante (volume total : 2100 ml).

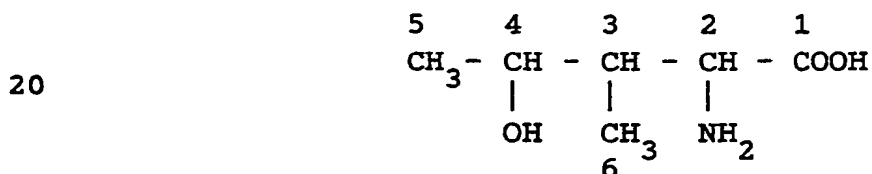
On concentre ensuite l'extrait obtenu sous pression réduite à 130 ml, et on fait passer le
35 concentrat sur une résine échangeuse de cations sous

forme H^+ (AMBERLITE IR 120, ou DOWEX 50Wx8) dans une colonne de 36 cm de hauteur et 2 cm de diamètre de façon à retenir le produit recherché sur cette colonne. Celui-ci est ensuite élué en utilisant une solution d'ammoniaque N ou 2N.

Après concentration et reprise par de l'éthanol à 70 %, le mélange est soumis à une chromatographie d'adsorption sur une colonne de 50 cm de hauteur et de 2,5 cm de diamètre remplie de gel de silice 60, 70-230 mesh. On sépare ainsi la 4 hydroxyisoleucine qui est éluée avec de l'éthanol à 70 % (250 ml).

Le produit est ensuite concentré sous vide et purifié par cristallisation avec addition d'éther diéthylique.

On a ainsi pu obtenir 0,6 g de 4 hydroxyisoleucine de formule :



titrant 99 % de pureté qui a été identifiée et caractérisée de la manière indiquée ci-dessous :

25 - Chromatographie sur couche mince (C.C.M)

Une solution hydro alcoolique (éthanol 70 % eau 30 %) de 4 hydroxyisoleucine ayant une concentration de 4 mg.ml⁻¹ est déposée sur une plaque recouverte de gel de silice G, soumise à une élution avec un mélange n-butanol/CH₃COOH/H₂O (3/2/1) ou phénol/eau (3:1). La plaque est ensuite chauffée à 110° C pendant 10 minutes et une solution acétonique de ninhydrine à 0,1 % est pulvérisée.

La 4 hydroxyisoleucine donne une seule tâche rouge-orangée à violette avec les deux systèmes de

solvants. Les Rf sont respectivement les suivants :

Rf (n Butanol-CH₃COOH-H₂O) : 0,36

Rf (Phenol-H₂O) : 0,45

- Spectroscopie R.M.N. (Appareil VARIAN EM 390)

5 Cette analyse a été effectuée à 90 MHz en utilisant une solution de 4 hydroxyisoleucine dans D₂O, et en tant que standard interne le T.S.S (Acide triméthyl silyl propane, sel de Na).

10 Les résonances ont été observées pour les valeurs suivantes :

- 0,95 et 1,25 ppm.

 Ces doublets sont attribuables respectivement aux protons des groupes CH₃ des carbones C₆ et C₅.

15 - 1,85 ppm

 Ce multiplet est attribuable au proton du C₃.

- 3,85 ppm

20 Ce multiplet est composé d'un doublet dû au proton du carbone C₂ et d'un multiplet dû au proton du carbone C₄

- Spectrométrie de masse par impact électronique

 Cette analyse a été réalisée sur un appareil JEOL JMS D 100 à 75 eV.

25 Les fragmentations suivantes ont été obtenues :

148[M + H]⁺ : 5 % , 102 [M + H - CO₂H₂]⁺ : 32 %

74[M + H - 74]⁺ = 92 % , 58 [M + H - 74 - 16]⁺ : 100 %

30 - Spectroscopie de masse par bombardement d'atomes rapides ou méthode FAB ("Fast Atom Bombardement").

 Il s'agit là d'une technique récente qui comporte une ionisation plus douce. Elle est, de ce fait, beaucoup mieux adaptée à la caractérisation des composés polaires labiles.

35 La méthode FAB est basée sur le principe

d'une production d'ions caractéristiques de la structure du composé testé par bombardement de celui-ci par un faisceau d'atomes rapides.

Le spectre de masse obtenu par cette méthode d'ionisation comporte :

- l'ion quasi moléculaire $[M + H]^+$ présent à m/z 148 : 100 %
- la perte d'une molécule d'eau est mise en évidence par la fragmentation m/z : 130 : 35 %
- la perte de CO_2H_2 à partir de m/z 148, se traduit par la formation de l'ion m/z 102 : 30 %
- l'ion m/z : 74 : 56 % correspond à la rupture en deux fragments (ion et neutre) de l'ion $[M + H]^+$

Afin d'établir que ces trois fragmentation se produisent bien à partir de l'ion m/z : 148 $[M + H]^+$, celui-ci est soumis à une autre collision selon la technique FAB/MS/MS. La composition des ions formés correspond bien à la filiation mise en évidence précédemment.

Les analyses susmentionnées permettent clairement de mettre en évidence l'identité et la pureté de la 4 hydroxyisoleucine obtenue ; on a en conséquence pu utiliser ce composé pour la mise en oeuvre de tests pharmacologiques permettant de vérifier l'activité antidiabétique de la 4 hydroxyisoleucine ; ces tests qui ont été respectivement effectués in vitro au niveau des cellules et des organes et in vivo chez l'animal sont résumés dans les exemples 2, 3 et 4.

Dans ces trois exemples, les hormones pancréatiques (insuline et glucagon) ont été évaluées par dosages radio-immunologiques.

La glycémie a été dosée à l'auto-analyseur Technicon par la méthode au ferricyanure de potassium.

Les résultats ont été soumis à une analyse de variance suivie du test de comparaison multiple.

5 Exemple 2.

Investigation au niveau des îlots de Langerhans isolés de pancréas de rat.

Après digestion du pancréas par la collagénase, les îlots de Langerhans qui possèdent des
10 cellules B sécrétant l'insuline ont été séparés des autres éléments du digestat, prélevés sous la loupe binoculaire, puis déposés dans des tubes d'incubation. Cette méthode, qui présente l'avantage de ne nécessiter qu'une faible quantité de substance permet
15 une étude directe des effets de la composition sur des cellules endocrines pancréatiques, en particulier des cellules B insulino-sécrétrices, à l'exclusion de toute interférence avec les tissus exocrines et annexes.

20 Sur des îlots isolés de rats Wistar, incubés en présence de 8,3 mM de glucose (1,5 g/l) pendant une heure, on a recherché l'effet de différentes concentrations de 4 hydroxyisoleucine sur la sécrétion d'insuline. Les résultats obtenus sont reportés sur le
25 schéma joint en annexe 1 sur lequel les histogrammes représentent pour chaque dose de 4 hydroxyisoleucine la sécrétion d'insuline mesurée sur 10 minutes.

Sur ce schéma, on peut noter qu'un effet stimulant sur la sécrétion apparaît pour une
30 concentration de 4 hydroxyisoleucine de 200 μ M (avec une incertitude inférieure à 5 %). Cette stimulation de la sécrétion augmente légèrement en fonction de la dose de 4 hydroxyisoleucine.

A titre comparatif, on a observé dans les
35 mêmes conditions les effets de deux analogues

structuraux de la 4 hydroxyisoleucine : l'isoleucine et la leucine, et on a pu constater que pour ces deux substances, l'effet stimulant sur la sécrétion d'insuline n'apparaît que pour des concentrations 50 à 100 fois supérieures.

Exemple 3

Investigation au niveau du pancréas isolé et perfusé de rat.

Pour réaliser ce test, le pancréas a été totalement isolé de tous les autres organes et tissus voisins (rate, estomac, duodénum, graisse épiloïque) et perfusé en circuit ouvert dans une chambre de perfusion, avec une solution physiologique. Cette préparation présente l'avantage de respecter l'intégrité fonctionnelle et vasculaire de l'organe, tout en le soustrayant aux influences régulatrices (humorales ou nerveuses) auxquelles il est habituellement soumis.

Dans cet exemple, les expériences ont été réalisées en présence d'une concentration de glucose de 8,3 mM. Dans ces conditions, on a étudié l'effet sur la sécrétion d'insuline d'une perfusion de 4 hydroxyisoleucine à la concentration de 200 μ M pendant 10 minutes. Le schéma joint en annexe 2, sur lequel les résultats de cette expérimentation sont reportés montrent clairement que la stimulation est immédiate et biphasique et persiste pendant toute la durée de la perfusion.

Pour "affiner" ces résultats, on a également étudié l'effet sur la sécrétion d'insuline de la 4 hydroxyisoleucine à des concentrations de 50 et 500 μ M. Les quantités d'insuline sécrétées pendant les 10 minutes de perfusion, sont indiquées ci-dessous :

	Sécrétion d'insuline (ng/10 mn)
5	
Glucose seul	810 ± 83
Glucose + 4 hydroxyisoleucine (50 µM)	1232 ± 93
Glucose + 4 hydroxyisoleucine (200 µM)	1520 ± 154
Glucose + 4 hydroxyisoleucine (500 µM)	2206 ± 213
10	

Ce tableau montre que l'effet stimulant augmente en fonction de la concentration de 4 hydroxyisoleucine.

15 Il est à noter qu'au cours de ces expériences, on n'a observé aucune modification du débit vasculaire pancréatique et du taux de glucagon pancréatique, hormone de contrerégulation qui tend in vivo à augmenter le taux de glycémie et par conséquent
20 à atténuer les effets de la stimulation de la sécrétion d'insuline.

Les résultats montrent clairement que la stimulation de la sécrétion d'insuline observée en présence de la composition est due à une stimulation
25 directe de la cellule B de l'îlot de Langerhans.

Exemple 4

Expérimentation "in vivo"

Au cours de cette expérimentation, des rats Wistar ont été anesthésiés puis munis de cathéters
30 dans les deux veines jugulaires. Un cathéter permet le prélèvement d'échantillons de sang nécessaires au dosage du glucose et de l'insuline plasmatiques. L'autre cathéter est utilisé pour l'injection intraveineuse de la substance à tester.

35 Le tableau joint en annexe 3 montre, chez le

rat Wistar anesthésié, préalablement nourri ad libitum, l'effet d'une administration aiguë par voie intraveineuse de 4 hydroxyisoleucine à la dose de 9 mg/300 g de poids vif sur l'insuline plasmatique d'une part, et la glycémie d'autre part.

Ce tableau montre que l'administration de 4 hydroxyisoleucine déclenche une augmentation immédiate et particulièrement importante du taux d'insuline plasmatique. La conséquence de cette hyperinsulinémie est une diminution de la glycémie. Cette réduction du taux de glucose circulant devient significative 15 minutes après l'injection et atteint environ 30 % par rapport à la valeur de départ à la 90ème minute.

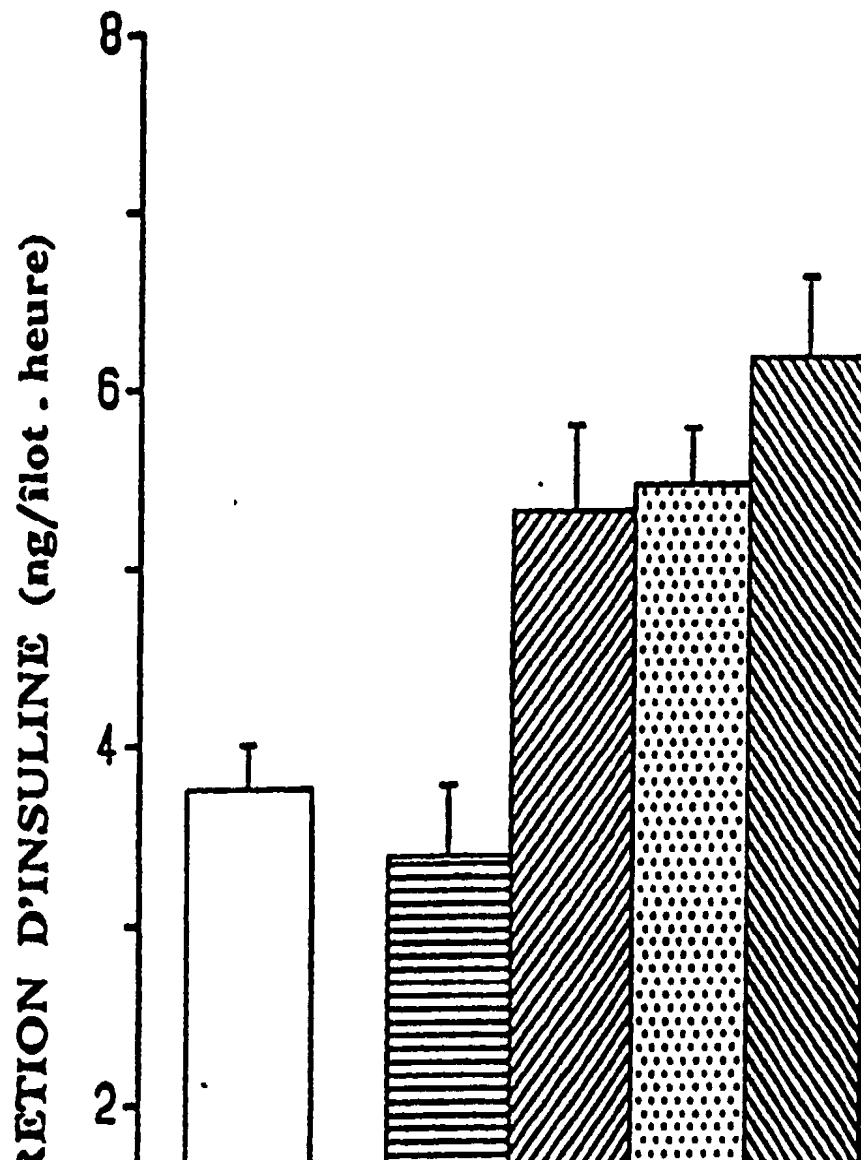
Dans ces conditions expérimentales, aucun effet latéral secondaire à l'injection de 4 hydroxyisoleucine n'a été observé : ni polypnée, ni tachycardie, ni hypoxie.

Les tests susmentionnés montrent clairement que la 4 hydroxyisoleucine est une substance qui a la propriété de stimuler puissamment la sécrétion d'insuline à tous les niveaux d'organisation : cellulaire, organe isolé, animal entier. "In vivo" l'induction de l'hyperinsulinémie a pour conséquence une réduction de la glycémie. Les tests "in vitro" démontrent que la 4 hydroxyisoleucine, aux concentrations de l'ordre de la μM , stimule la sécrétion d'insuline par un effet direct sur la cellule B de l'îlot de Langerhans.

Il est donc clair que la 4 hydroxyisoleucine pourrait avantageusement être utilisée en tant que produit actif dans des compositions destinées à la thérapeutique du diabète non insulino-dépendant.

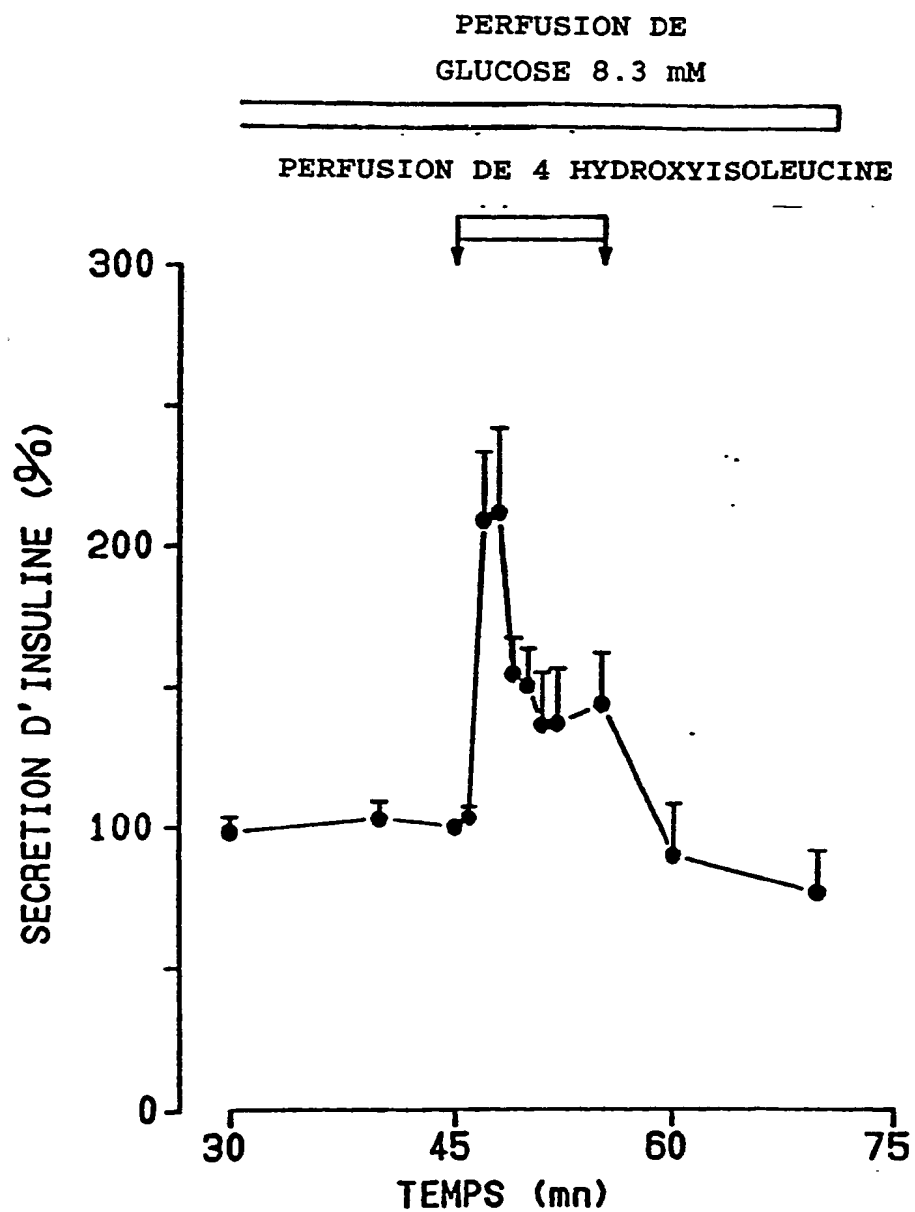
ANNEXE 1

Evaluation de l'effet direct de la 4 hydroxyisoleucine sur la sécrétion d'insuline d'îlots de Langerhans isolés.



ANNEXE 2

Effet sur la sécrétion d'insuline d'un pancréas isolé de rat d'une perfusion de 4 hydroxyisoleucine à la concentration de 200 μ M pendant 10 min.



ANNEXE 3

Effet d'une injection intraveineuse de 4 hydroxyisoleucine à la dose de 9 mg/300 g de poids vif chez le rat Wistar anesthésié, nourri ad libitum, sur l'insuline plasmatique et la glycémie.

Minutes	- 15	- 10	- 2	2	5	15	30	45	60	90
Composition I.V.										
Insuline Plasmatique (ng/ml)	2.8 ± 0.2	2.4 ± 0.1	3.4 ± 1.1	4.4 ± 1.1	9.1 ± 1.0	18.5 ± 1.5	18.6 ± 1.5	14.5 ± 4.8	14.4 ± 4.8	14.9 ± 5.2
Glycémie (g/l)	1.32 ± 0.09	1.38 ± 0.09	1.34 ± 0.07	1.26 ± 0.08	1.18 ± 0.04	0.94 ± 0.09	0.99 ± 0.10	0.99 ± 0.12	0.94 ± 0.10	0.89 ± 0.12

14

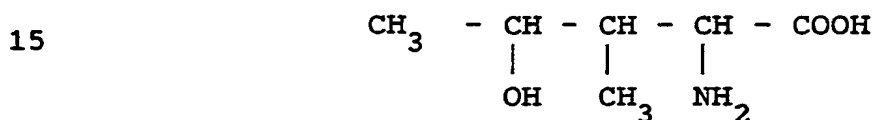
2695317

R E V E N D I C A T I O N S

1) Composition antidiabétique, caractérisée en ce qu'elle renferme en tant que substance active, à l'état libre ou combiné, au moins un acide aminé mono ou polyhydroxylé et/ou ses formes lactoniques.

2) Composition antidiabétique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle renferme un produit provenant de la métabolisation de la substance active.

3) Composition antidiabétique selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la substance active est la 4 hydroxyisoleucine de formule :



et/ou sa forme lactonique.

4) Composition antidiabétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la substance active est d'origine végétale.

5) Composition antidiabétique selon la revendication 4, caractérisée en ce que la substance active est obtenue à partir de trigonelles (Trigonella sp.).

6) Composition antidiabétique selon la revendication 5, caractérisée en ce que la substance active est extraite de graines de fenugrec (Trigonella foenum graecum L.).

7) Composition antidiabétique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 douée de propriétés insulino stimulantes, caractérisée en ce qu'elle peut servir de réactif pour l'exploration fonctionnelle du pancréas endocrine.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9210644
FA 476024

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	PHYTOCHEMISTRY, vol. 12, no. 7, 1973, pages 1707-1711, Pergamon Press, Oxford, GB; L. FOWDEN et al.: "4-Hydroxyisoleucine from seed of Trigonella foenum-graecum" * Le document en entier *	1-7
A	THE BRITISH JOURNAL OF NUTRITION, vol. 68, no. 1, juillet 1992, pages 217-229; A.J. EVANS et al.: "Relationship between structure and function of dietary fibre: a comparative study of the effects of three galactomannans on cholesterol metabolism in the rat" * Le document en entier, surtout pages 225,226 *	1-7
A	LIPIDS, vol. 26, no. 3, mars 1991, pages 191-197; Y. SAUVAIRE et al.: "Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek" * Le document en entier *	1-7
A	EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, vol. 42, no. 1, janvier 1988, pages 51-54; Z. MADAR et al.: "Glucose-lowering effect of fenugreek in non-insulin dependent diabetics" * Le document en entier *	1-7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		A 61 K
		-/-
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
09-12-1992		MAIR J.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FR 9210644
FA 476024

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	PHYTOCHEMISTRY, vol. 28, no. 7, 1989, pages 1835-1841, Pergamon Press plc., GB; N.W. ALCOCK et al.: "Stereochemistry of the 4-hydroxyisoleucine from Trigonella foenum-graecum" * Abrégé: "Introduction" * -----	1-7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
Date d'achèvement de la recherche 09-12-1992		Examinateur MAIR J.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		